

Molecular imaging of atherosclerosis and thrombus formation

Citation for published version (APA):

Miserus, R. J. H. M. (2010). *Molecular imaging of atherosclerosis and thrombus formation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.
<https://doi.org/10.26481/dis.20100303rm>

Document status and date:

Published: 01/01/2010

DOI:

[10.26481/dis.20100303rm](https://doi.org/10.26481/dis.20100303rm)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial vessel wall which starts already at young age and progresses during ageing. Eventually, thrombus formation can occur due to rupture or erosion of atherosclerotic lesions, which can lead to life-threatening events such as myocardial infarction and stroke. This indicates the importance of proper detection and assessment of atherosclerotic lesions and thrombus formation. We hypothesized that molecular imaging can further improve the assessment of the phenotype of the atherosclerotic plaque and thrombus formation. Molecular imaging is a relatively young and rapidly developing research field that uses imaging agents to detect specific disease-related targets. In the present thesis, the potential of a FDA approved MRI contrast agent and several newly developed imaging agents for the assessment of atherosclerosis and thrombus formation were investigated. Magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography (PET) were used as imaging modalities. In addition, two-photon laser-scanning microscopy (TPLSM) was used for the validation on sub-cellular level.

Development and validation of novel imaging technologies to assist translational studies in atherosclerosis

Chapter 2 presents a literature review, summarizing different imaging technologies that can be used for invasive and non-invasive detection of atherosclerotic lesions such as: ultrasound, computed tomography (CT), positron emission tomography (PET), single photon emission tomography (SPECT), magnetic resonance imaging (MRI), angiography, optical computed tomography, and thermography. Additionally, it provides an overview of molecular imaging agents that have been used to detect specific features of plaque destabilization, such as inflammation, macrophage activation, angiogenesis, lipid accumulation, and thrombus formation. For non-invasive molecular imaging, MRI and PET are very promising modalities since they allow imaging with high spatial resolution and high sensitivity, respectively.

Contrast-enhanced magnetic resonance vessel wall imaging in a rabbit model of atherosclerosis: comparison of Gadofosveset and Gd-DTPA

Since albumin is abundant in atherosclerotic lesions, the potential of the albumin-binding contrast agent Gadofosveset (also published under the name Vasovist®) for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of atherosclerotic lesions was examined in **chapter 3**. For this study, Gadofosveset (0.05 mmol/kg) was administered to normal rabbits and to rabbits with atherosclerotic lesions in the abdominal aorta. Gadofosveset was compared with the clinically available Gd-DTPA

(0.5 mmol/kg). A different dose was used to correct for the higher r_1 relaxivity of Gadofosveset when bound to albumin. After pre- and postcontrast MRI, the animals were sacrificed and presence of microvessels and albumin content were determined in the abdominal aorta. Finally, proton induced x-ray emission (PIXE)-analysis was performed on a few specimens to determine the amount and distribution of Gadofosveset and Gd-DTPA within the vessel walls.

It was demonstrated that the use of Gadofosveset resulted in increased MRI signal intensities of atherosclerotic versus normal vessel walls, while Gd-DTPA did not discriminate between rabbits with atherosclerotic lesions and normal rabbits. Additionally, albumin content and microvessel density increased in the vascular wall of atherosclerotic rabbits. PIXE analysis demonstrated that the atherosclerotic and normal vessel walls contained equal amounts of Gadofosveset and Gd-DTPA. When corrected for dose and clearance, the gadolinium content was similar in the different study groups. We hypothesized that binding of Gadofosveset to intraplaque albumin resulted in a drastic relaxivity increase, leading to signal amplification. The data suggest that Gadofosveset has potential for imaging of atherosclerosis.

Molecular imaging of murine atherosclerosis using RANTES-based imaging agents: a feasibility study

Chapter 4 presents a feasibility study in which a novel molecular imaging agent was designed and validated. In this study, mRNA analysis and immunohistochemistry demonstrated strong upregulation of CCR5 mRNA and protein expression levels in ruptured compared to stable human carotid lesions. Therefore, newly developed CCR5-targeting imaging agents were investigated for their potential in the assessment of atherosclerotic lesions. Three RANTES-based (CCR5 ligand) imaging agents were synthesized: RANTES-rhodamine (for TPLSM), RANTES-DTPA for capturing gallium-68 (for PET imaging), and bimodal-RANTES containing rhodamine and the DTPA-chelate (for TPLSM and PET). Uptake of RANTES-rhodamine and RANTES-DTPA was evaluated *in vitro* using murine bone marrow-derived macrophages (BMMs) and CCR5 negative control cells (3T3 cells). Additionally, RANTES-based agents were intravenously administered to ApoE^{-/-} mice to determine the *in vivo* uptake of RANTES-rhodamine and bimodal-RANTES in atherosclerotic lesions. After sacrificing the animals, the excised atherosclerotic lesions were imaged with TPLSM and microPET.

TPLSM demonstrated internalization of RANTES-rhodamine in BMMs. A significant increase of RANTES-DTPA-⁶⁸Ga uptake was found in BMMs compared to control 3T3 cells. Intravenously administered RANTES-rhodamine and bimodal-RANTES in ApoE^{-/-} mice and subsequent visualization with TPLSM demonstrated that both imaging agents internalized in macrophages present in the

atherosclerotic lesions. Additionally, microPET using the bimodal-RANTES agent showed increased activity in atherosclerotic murine lesions compared to vessels of non-atherosclerotic C57BL6 mice. These findings indicate the potential of RANTES-based imaging agents for the assessment of atherosclerotic lesions. However, additional experiments are warranted to validate these initial results.

Optical and magnetic resonance imaging of cell death and platelet activation using Annexin A5-functionalized quantum dots

In **chapter 5**, annexin A5-functionalized quantum dot-based nanoparticles were used for the detection of phosphatidylserine (PS) with MRI and TPLSM. PS is expressed on apoptotic cells. Since apoptotic cells contribute to the formation of the necrotic core and weakening of the overlying fibrous cap, this annexin A5-functionalized nanoparticle could aid in the assessment of atherosclerosis. In addition, this nanoparticle might be useful for the detection of thrombus formation as PS is also expressed on activated platelets. To validate the annexin A5-functionalized nanoparticles, apoptotic Jurkat cells and *in vitro* generated thrombi were incubated with the nanoparticles and subsequently visualized with MRI and TPLSM. To demonstrate its feasibility as a target specific contrast agent for the detection of cell death in the vascular wall, a murine carotid artery was damaged using a metal wire, inducing rapid PS exposure. After sacrificing the mouse, the damaged and undamaged carotid arteries were excised and exposed to the annexin A5-functionalized quantum dot-based nanoparticles and imaged with TPLSM and MRI.

Increased MR signal intensities were found in the apoptotic Jurkat cells and the *in vitro* generated thrombi exposed to annexin A5-functionalized nanoparticles. TPLSM demonstrated that the nanoparticles bound to the apoptotic Jurkat cells and the activated platelets. In addition, TPLSM demonstrated that the nanoparticles also bound to PS-expressing cells in the wire-injured carotid artery. Slightly higher MR signal intensities were found in the wire-injured carotid artery compared to the undamaged control artery. These nanoparticles demonstrated their potential for the detection of apoptotic cells and activated platelets using MRI and TPLSM. Therefore, this nanoparticle is a promising bimodal contrast agent for future *in vivo* imaging studies.

Molecular MRI of early thrombus formation using a bimodal α_2 -antiplasmin-based contrast agent

In **chapter 6**, the potential of a novel fibrin targeted contrast agent for the detection of early thrombus formation was investigated. Specific detection of early thrombus formation is still challenging in clinical practice and might aid in the

selection of patients that are eligible for fibrinolytic therapy as the resistance of thrombi against fibrinolysis increases with time. Since activated factor XIII crosslinks α_2 -antiplasmin to fibrin during the early phases of thrombus formation, a bimodal α_2 -antiplasmin-based contrast agent and control agent (1 amino acid substitution) were synthesized. *In vitro* generated thrombi were incubated with the contrast agents and subsequently imaged with TPLSM and MRI. To check the presence of factor XIII and α_2 -antiplasmin in different stages of thrombus formation, immunohistochemical stainings were performed on sections of human pulmonary thrombo-emboli. In addition, the bimodal α_2 -antiplasmin-based contrast agents were administered (5.0 $\mu\text{mol/kg}$) to mice containing fresh or 24-48 hours old (iron chloride-induced) thrombi in the carotid artery. After non-invasive MRI, mice were sacrificed and the excised carotid arteries were imaged with TPLSM.

In the *in vitro* generated thrombi that were exposed to the α_2 -antiplasmin-based contrast agent, hyperintense MR signal intensities were found at the edge of the thrombus while no hyperintense signal was observed using the control contrast agent. TPLSM demonstrated that the α_2 -antiplasmin-based contrast agent bound to fibrin. In the human pulmonary thrombo-emboli sections, strong α_2 -antiplasmin immunohistochemical staining was found in fresh compared to lytic and organized thrombi. *In vivo* contrast agent administration to mice containing fresh thrombi resulted in increased contrast-to-noise ratios at the site of thrombus formation compared to the use of the control contrast agent and the α_2 -antiplasmin-based contrast agent administration 24-48 hours after thrombus formation. These findings demonstrate that non-invasive MR visualization of early thrombus formation is feasible using the α_2 -antiplasmin-based contrast agent.

Discussion and conclusion

In **chapter 7**, the findings and implications of this thesis were discussed in relation to the available literature about molecular imaging of atherosclerosis and thrombus formation.

In conclusion, the potential of the FDA-approved contrast agent Gadofosveset and several newly developed molecular imaging agents for the assessment of atherosclerosis and thrombus formation were investigated and validated in this thesis.

Nederlandse samenvatting

Atherosclerose, in de volksmond beter bekend als aderverkalking, is een chronische aandoening van de vaatwand van slagaders die al op jonge leeftijd kan beginnen en zich in de jaren daarna verder ontwikkelt. In een bepaald stadium van plaque ontwikkeling, kan de plaque scheuren (ruptureren), waardoor er bloedstolsels (trombi) gevormd kunnen worden. Plaques met een hoog risico op ruptureren worden ook wel instabiele plaques genoemd. De gevormde trombi kunnen levensgevaarlijk zijn, aangezien ze kunnen leiden tot een hart- of herseninfarct (beroerte). Om deze reden is het van groot belang om atherosclerotische plaques en trombusvorming zo goed mogelijk in beeld te brengen. Contrastmiddelen waarmee specifieke moleculen of processen ("molecular imaging") in beeld gebracht kunnen worden, kunnen de beoordeling van atherosclerose en trombusvorming mogelijkwijs verbeteren. Molecular imaging is een relatief jong onderzoeksveld dat zich snel ontwikkelt. In dit proefschrift zal de mogelijkheid voor het in beeld brengen en beoordelen van atherosclerotische plaques en trombusvorming van een reeds door de "Food and Drug Administration" (FDA) goedgekeurd Magnetische Resonantie Imaging (MRI) contrastmiddel en een aantal nieuw ontwikkelde moleculaire contrastmiddelen worden onderzocht. MRI en Positron Emissie Tomografie (PET) zijn hierbij gebruikt als afbeeldingstechnieken. Tevens is fluorescentie microscopie (twee-foton laser-scanning microscopie; TPLSM) gebruikt om de locatie van de gebruikte contrastmiddelen te controleren op microscopisch niveau.

Ontwikkeling en validatie van nieuwe technieken voor het afbeelden van atherosclerose

Hoofdstuk 2 is een literatuuroverzicht over de verschillende afbeeldingstechnieken die gebruikt kunnen worden voor het afbeelden van atherosclerotische plaques zoals: "ultrasound", "computed tomography", PET, "single photon emission computed tomography" (SPECT), MRI, angioscopie, "optical computed tomography", en thermografie. Tevens bevat dit hoofdstuk een overzicht van moleculaire contrastmiddelen die gebruikt zijn voor het detecteren van processen die een rol spelen in de vorming en ruptuur van risicovolle plaques zoals ontsteking, activatie van ontstekingscellen, de vorming van nieuwe vaatjes, stapeling van vetten en trombusvorming. Voor het afbeelden van atherosclerotische plaques zijn MRI en PET veelbelovende afbeeldingstechnieken vanwege respectievelijk hun vermogen om kleine details af te beelden en hun gevoeligheid.

Contrast versterkte MRI van de atherosclerotische vaatwand in een konijnenmodel: vergelijking tussen Gadofosveset en Gd-DTPA

Aangezien het plasma-eiwit albumine veel voorkomt in atherosclerotische plaques is in **hoofdstuk 3** de toegevoegde waarde van het aan albumine bindende contrastmiddel Gadofosveset (ook gepubliceerd onder de naam Vasovist®) voor het afbeelden van atherosclerotische plaques met MRI onderzocht. Voor deze studie is Gadofosveset (0.05 mmol/kg) toegediend aan gezonde konijnen en konijnen met atherosclerotische plaques in de buikslagader. Gadofosveset is vergeleken met het in de kliniek gebruikte contrastmiddel Gd-DTPA (0.5 mmol/kg). Nadat er zowel vóór als ná contrasttoediening MRI opnames waren gemaakt werd de buikslagader van de konijnen gebruikt voor verdere analyse. Er is onderzocht of er albumine en kleine bloedvaatjes aanwezig waren in de vaatwand. Tevens zijn er analyses verricht op de uitgenomen buikslagaders met behulp van de zogenaamde “proton induced x-ray emission” (PIXE) techniek om de hoeveelheid en verdeling van Gadofosveset en Gd-DTPA in de vaatwand te bepalen. Deze studie liet zien dat het contrastmiddel Gadofosveset een verhoogd MRI-signaal veroorzaakte in de atherosclerotische vaatwand vergeleken met de normale gezonde vaatwand, terwijl dit met Gd-DTPA niet mogelijk was. Het bleek dat in de vaatwand van de atherosclerotische konijnen de hoeveelheid albumine groter was dan in de vaatwand van de gezonde konijnen. Bovendien waren er meer kleine bloedvaatjes aanwezig in de vaatwand van de atherosclerotische konijnen. Tevens is aangetoond dat de atherosclerotische en normale vaatwanden gelijke hoeveelheden Gadofosveset bevatten. Ook werden er gelijke hoeveelheden Gd-DTPA teruggevonden in de atherosclerotische en normale vaten. Wanneer de gevonden hoeveelheden gecorrigeerd worden voor de toegediende dosis contrastmiddel en de klaring hiervan, bleken de gadolinium hoeveelheden in de verschillende studiegroepen vergelijkbaar te zijn. Het verhoogde MRI-signaal na Gadofosveset, maar niet na Gd-DTPA toediening kan meest waarschijnlijk verklaard worden door de aanwezigheid van albumine in de atherosclerotische plaques. Binding van Gadofosveset aan albumine leidt namelijk tot een sterk verhoogd MRI-signaal. Samenvattend betekenen deze resultaten dat het contrastmiddel Gadofosveset een veelbelovend contrastmiddel is voor de afbeelding van atherosclerotische plaques.

Molecular imaging van atherosclerose waarbij gebruik gemaakt wordt van contrastmiddelen die zijn gebaseerd op RANTES

Hoofdstuk 4 is een studie waarin een aantal belangrijke stappen staan beschreven die nodig zijn voor de ontwikkeling en validatie van een nieuwe moleculaire tracer/probe. In dit hoofdstuk is aangetoond dat de chemokine receptor 5 (CCR5)

meer aanwezig is in geruptureerde atherosclerotische plaques vergeleken met niet geruptureerde atherosclerotische plaques. Om deze reden hebben we een moleculaire tracer/probe gemaakt die gebaseerd is op een eiwit dat aan CCR5 bindt. Dit eiwit heet RANTES. De mogelijkheden van dit contrastmiddel om atherosclerotische plaques aan te tonen zijn in dit hoofdstuk onderzocht. In totaal zijn drie op RANTES gebaseerde deeltjes gemaakt: 1) RANTES-rhodamine, rhodamine is een fluorescerend deeltje waardoor visualisatie met fluorescentie microscopie (TPLSM) mogelijk is. 2) RANTES-DTPA-Gallium, als DTPA aan RANTES wordt toegevoegd is het vervolgens mogelijk om een isotoop die zichtbaar is met PET, namelijk gallium-68, te koppelen aan het RANTES. 3) Bimodaal-RANTES, doordat dit middel zowel rhodamine als het DTPA bevat (voor de koppeling van gallium-68), kan dit deeltje zichtbaar gemaakt worden met zowel TPLSM als PET (dit wordt bimodaliteit genoemd). De opname van RANTES-rhodamine en RANTES-DTPA in cellen buiten het lichaam is onderzocht door gebruik te maken van cellen die CCR5 positief zijn en controlecellen die CCR5 negatief zijn. Tevens zijn RANTES-rhodamine en het bimodale RANTES via de bloedstroom toegediend aan muizen met atherosclerose om de opname van deze contrastmiddelen in levende wezens te onderzoeken. Vervolgens werden de uitgenomen atherosclerotische plaques afgebeeld met TPLSM en PET. TPLSM liet zien dat RANTES-rhodamine werd opgenomen in de CCR5-positieve cellen. Ook bleek dat RANTES-DTPA met gallium-68 in hogere mate werd opgenomen in de CCR5 positieve cellen in vergelijking met de CCR5-negatieve cellen. Toediening van RANTES-rhodamine en het bimodale RANTES in muizen liet met behulp van TPLSM zien dat beide contrastmiddelen werden opgenomen in de macrofagen die aanwezig waren in de atherosclerotische plaque. Tevens werd er met behulp van PET een hogere activiteit in de atherosclerotische plaque gevonden dan in de vaten van controlemuizen zonder atherosclerose. Deze resultaten laten zien dat het mogelijk is de op RANTES gebaseerde contrastmiddelen te gebruiken voor het afbeelden van atherosclerotische plaques. Echter, er moeten nog vervollexperimenten worden uitgevoerd om deze bevindingen te bevestigen.

Optische afbeelding en MRI van celdood en geactiveerde plaatjes met behulp van Annexine A5 gefunctionaliseerde quantum dots

In **hoofdstuk 5** is een ander bimodaal deeltje gebruikt dat bestaat uit een quantum dot (fluorescerend deeltje) waaraan gadolinium (contrastmiddel voor MRI) is gekoppeld. Hierdoor is het deeltje zichtbaar met TPLSM en MRI. Ook is Annexine A5 aan dit deeltje gekoppeld, waardoor het specifiek gericht is op cellen die geprogrammeerde celdood (apoptose) ondergaan. Tijdens het proces van apoptose wordt een specifiek molecuul, fosfatidylserine (PS), van de binnenkant naar de buitenkant van de cel verplaatst. Annexine A5 kan aan PS hechten. PS is ook

aanwezig aan de buitenkant van geactiveerde bloedplaatjes, die aanwezig zijn in trombi. Hierdoor zouden deze deeltjes gebruikt kunnen worden om zowel apoptotische cellen als trombi in beeld te brengen. Om dit te onderzoeken werden apoptotische cellen en buiten het lichaam gemaakte trombi blootgesteld aan dit contrastmiddel, waarna ze afgebeeld zijn met MRI en TPLSM. Tevens werd de mogelijkheid van dit contrastmiddel voor het detecteren van apoptotische cellen in de vaatwand gedemonstreerd door schade te veroorzaken aan de halsslagader van een muis, waarna de halsslagader werd blootgesteld aan het contrastmiddel. Met MRI werden verhoogde signaal intensiteiten gevonden in de cellen en trombi die blootgesteld waren aan het contrastmiddel. TPLSM liet zien dat het bimodaal deeltje bond aan de apoptotische cellen en de geactiveerde bloedplaatjes in de trombi. Tevens was er een positief signaal te zien in de beschadigde vaatwand met behulp van MRI en TPLSM. In toekomstige studies zal dit contrastmiddel in levende proefdieren moeten worden gevalideerd.

Moleculaire MRI van vroege trombusvorming met behulp van een op α_2 -antiplasmin gebaseerd bimodaal gelabeld contrastmiddel

In **hoofdstuk 6** is een nieuw contrastmiddel voor de detectie van vers gevormde trombi onderzocht. Tot op heden is de detectie van verse trombi in de klinische praktijk moeilijk uitvoerbaar. Als dit wel mogelijk zou zijn, zou het de selectie van patiënten die nog in aanmerking komen voor een therapie waarbij de gevormde trombus kan worden opgelost (fibrinolytische therapie; fibrinolyse) verbeteren. De mate waarin trombi bestand zijn tegen fibrinolyse wordt namelijk groter naarmate de trombi ouder worden. Aangezien α_2 -antiplasmin bindt aan fibrine (een bestanddeel van trombi) gedurende de vroege fase van de trombusvorming, werd een bimodaal contrastmiddel gemaakt gebaseerd op α_2 -antiplasmin. Het contrastmiddel werd bimodaal gemaakt door een fluorescerend deeltje (rhodamine) en een contrastmiddel voor MRI (gadolinium) hieraan te binden. Tevens werd een controle contrastmiddel gemaakt dat geen binding kon aangaan met fibrine. Om dit contrastmiddel te testen werden buiten het lichaam gevormde trombi blootgesteld aan beide contrastmiddelen en vervolgens afgebeeld met MRI en TPLSM. De aanwezigheid van α_2 -antiplasmin in de verschillende stadia van de trombusvorming werd gecontroleerd aan de hand van kleuringen van trombi afkomstig uit mensen. Bovendien werd trombusvorming opgewekt in de halsslagaders van een aantal muizen, waarna het op α_2 -antiplasmin gebaseerde contrastmiddel via de bloedstroom werd toegediend (5.0 $\mu\text{mol/kg}$) direct na (verse trombus) en 24-48 uur (oude trombus) na het opwekken van trombusvorming. Na afbeelding met MRI werd de halsslagader van de muis bekeken met TPLSM. Een verhoogd MRI-signaal werd teruggevonden aan de randen van buiten het lichaam gevormde trombi die blootgesteld waren aan het op α_2 -antiplasmin gebaseerde

contrastmiddel. TPLSM van deze trombi toonde aan dat het op α_2 -antiplasmin gebaseerde contrastmiddel aan het in de trombi aanwezige fibrine bond. De kleuringen van trombi afkomstig van mensen toonde aan dat α_2 -antiplasmin voornamelijk aanwezig was in verse trombi vergeleken met oudere trombi. Toediening van het op α_2 -antiplasmin gebaseerde contrastmiddel aan muizen met een verse trombus resulteerde in een verhoogd MRI-sigitaal op de plaats waar de trombusvorming was opgewekt in vergelijking met de 24-48 uur oude trombi. De behaalde resultaten tonen aan dat de detectie van vroege trombusvorming mogelijk is met behulp van het op α_2 -antiplasmin gebaseerde contrastmiddel.

Discussie en conclusie

In **hoofdstuk 7** zijn de resultaten van dit proefschrift bediscussieerd en vergeleken met de aanwezige literatuur over moleculaire afbeeldingstechnieken van atherosclerose en trombusvorming.

Geconcludeerd kan worden dat het contrastmiddel Gadofosveset en de verschillende nieuwe moleculaire contrastmiddelen perspectieven bieden voor het in beeld brengen en beoordelen van atherosclerotische plaques en trombusvorming.